

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2001-215226

(43)Date of publication of application : 10.08.2001

(51)Int.CI. G01N 33/573
G01N 33/50

(21)Application number : 2000-022983 (71)Applicant : MARUHA CORP
OSAKA BIOSCIENCE INSTITUTE

(22)Date of filing : 31.01.2000 (72)Inventor : TOKUGAWA YOSHIHIRO

ODA KOJI
SEIKI KOSUKE
NAKAJIMA HIROSHI
SATO NOBUYUKI
URADE YOSHIHIRO

(54) METHOD OF DETECTING AMNIORPHEXIS

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To accurately and quickly detect amniorrhesis, and to reduce a burden to a patient.

SOLUTION: A concentration of a human ribocharin type prostaglandin D synthetase in a body fluid sample collected from the subject is measured in this method.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

(10)日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開2001-215226

(P2001-215226A)

(43)公開日 平成13年8月10日 (2001.8.10)

(51)Int.Cl'

G 0 1 N 33/573
33/50

識別記号

F I

G 0 1 N 33/573
33/50

テ-7コ-ト*(参考)

A 2 G 0 4 5
J

審査請求 未請求 請求項の数5 O L (全6頁)

(21)出願番号

特願2000-22983(P2000-22983)

(22)出願日

平成12年1月31日 (2000.1.31)

(71)出願人 000003274

マルハ株式会社

東京都千代田区大手町1丁目1番2号

(71)出願人 390000745

財団法人大阪バイオサイエンス研究所

大阪府吹田市古江台6丁目2番4号

(72)発明者 徳川 吉弘

大阪府堺市鳳中町10-14-15

(72)発明者 齋田 浩司

茨城県つくば市和台16-2 マルハ株式会社

中央研究所内

(74)代理人 100089705

弁理士 社本 一夫 (外5名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 破水の検出方法

(57)【要約】

【課題】正確、迅速に、かつ被験者に対する負担が少なく破水を検出できる方法を提供する。

【解決手段】被験者より採取した体液試料中のヒトリボカリン型プロスタグランジンD合成酵素濃度を測定することを特徴とする、破水の検出方法。

【特許請求の範囲】

【請求項1】被験者より採取した体液試料中のヒトリポカリソ型プロスタグランジンD合成酵素濃度を測定することを特徴とする、破水の検出方法。

【請求項2】体液試料中のヒトリポカリソ型プロスタグランジンD合成酵素濃度の測定を、免疫学的測定法により行うことを特徴とする、請求項1に記載の方法。

【請求項3】体液試料中のヒトリポカリソ型プロスタグランジンD合成酵素濃度の測定を、ヒトリポカリソ型プロスタグランジンD合成酵素に特異的なモノクローナル抗体を用いるサンドイッチELISA法により測定する、請求項2記載の方法。

【請求項4】体液試料が頸管分泌液または膣内分泌液である、請求項1から3の何れかに記載の方法。

【請求項5】破水が前期破水である、請求項1から4の何れかに記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、破水の検出方法、詳しくは、既存の方法では正確に検出できないような破水をも正確に検出することのできる破水の検出方法である。

【0002】

【従来の技術】妊娠22週から37週未満での分娩を早産といい、全妊娠の約10%に起こるといわれている。陣痛が起こる前の破水を前期破水(PROM)といい、37週未満に破水が起きたものをpreterm PROM(PPROM)と呼ぶ。PPROMは全妊娠の1-2%に起こり、早産の30-40%はPPROMが原因であると報告されている(Arias F. and Tamich P., *Obstet Gynecol*, 60, 277-281, 1982)。

【0003】PPROMに合併する重篤な症状としては、母体の敗血症や死亡、胎盤早期剥離、高い帝王切開率、胎児の死亡、奇形、関節拘縮、新生児の肺低形成や呼吸窮迫症候群、新生児の敗血症や脳室内出血などが挙げられる。また、新生児に精神的、肉体的な欠陥を長期的に残す場合がある。一方、妊娠3週以降に起こる破水であるterm PROMでは、母体の子宮内感染症や胎児の臍帯圧迫などが問題となる場合がある。従って、母体や胎児(新生児)をこれら合併症から守るために、PROMに対して適切かつ迅速な処置を行う必要がある。

【0004】破水の原因と予後には妊娠週数が重要な意味を持つことから、そのマネジメントは妊娠週数によって異なる(French J.I. and McGregor J.A., *Semin Perinatol*, 20, 344-368, 1996)。従って、破水時期を正確に知ることは、PROMのマネジメントにおいて非常に重要であると考えられている。

【0005】従来、破水の診断は、膣鏡を用いて膣内に漏出してきた羊水を確認することにより行われてきた。また、これを補完するために、Nitrazine testやFern testが行われている(Friedman M.L. and McEllin T.W., *Obstet Gynecol*, 260, 12410-12415, 1985; Urade Y., Wata-

bste Gynecol, 104, 544-550, 1996)。前者は、Nitrazine paperを用いて膣分泌液のpHを測定するもので、通常pH4.5-6.0の膣分泌液にpH7.1-7.3の羊水が漏出してくるとpHが上昇することによって破水を判断する。しかしながら、精液の混入やアルカリ性抗菌剤、細菌性膣症の影響を受け易く、偽陽性率は17.4%であり、偽陰性率は9.7%であると報告されている(Atterbury J.L., Groome L.J., and Hoff C., *Obstet Gynecol*, 92, 384-389, 1998)。後者のFern testは、後膣円蓋部のぬぐい液をスライドグラス上に塗布し乾燥させると、破水している場合には羊歯状結晶が形成される(fernning)ことを利用している。本法の偽陽性率は5.8%、偽陰性率は12.9%と報告されている(Atterbury J.L., Groome L.J., and Hoff C., *Obstet Gynecol*, 92, 384-389, 1998)。しかしながら、いずれの方法においても、膣鏡検査において分泌液の存在が確認できないような場合には、診断が困難であるとされている。

【0006】しかも、このような診断困難な状況は、PPROMが疑われた患者の25%に昇るとの報告があり(Ladfors L., Mattsson L.A., Eriksson M., and Fallo O., *Acta Obstet Gynecol Scand*, 76, 739-742, 1997)。大きな問題となっている。このような状況下でFern testを行うと、偽陽性率が21%、偽陰性率が41%にはねあがるとの報告もある(DeHaan H.H., Offermans P.M., Smits F., Schouten H.P., and Peeters U., *Am J Perinatol*, 11, 45-50, 1994)。

【0007】このような状況下において、破水の診断を正確かつ迅速に行える方法が望まれており、ジアミノオキシダーゼ、 α -フェトプロテイン、胎児性フィプロネクチン(以下fFNといふ)などが破水を検出しうる候補化合物として挙げられている(Arias F., Gonzalez-Ruiz A.R., and Jacobson R.L., *Curr Opin Obstet Gynecol*, 11, 141-147, 1999)。しかしながら、精液や血液の混入による影響や、膣炎、頸管炎の影響を受けやすいなど問題点も多く、現状では未だ満足できる診断方法は確立されていない。

【0008】

【発明が解決しようとする課題】本発明の課題は、上述した検査法より正確かつ迅速であり、被験者に対する負担が少なく破水を検出できる方法を提供することにある。

【0009】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、上記課題を解決するためにヒトリポカリソ型プロスタグランジンD合成酵素(以下L-PGDSといふことがある)に着目した。

【0010】L-PGDSは、各種プロスタグランジン類の共通の前駆体であるPGH2から、睡眠誘発作用をはじめとした各種生理作用を示すPGD2への異性化を触媒する酵素である(Urade Y., Fujimoto N., and Hayaishi O., *J. Biol. Chem.*, 260, 12410-12415, 1985; Urade Y., Wata-

nabe K., and Hayaishi O., *J. Lipid Mediator Cells Signaling*, 12, 257-273, 1995)。近年、このL-PGDSが、ヒト脳脊髄液(CSF)中に多量に存在することが知られていた β -トレースと同一であることが明らかにされた(Hoffmann A., Conradt H.S., Gross G., Nimtz M., Lottspeich F., and Wurster U., *J. Neurochem.*, 61, 451-456, 1993; Zahn M., Mader M., Schmidt B., Bollensen E., and Felgenhauer K., *Neurosci. Lett.*, 154, 93-95, 1993; Watanabe, K., Urade Y., Mader M., Murphy C., and Hayaishi O., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 203, 1110-1116, 1994)。

【0011】L-PGDSが β -トレースと呼ばれていた時代より、本タンパクが羊水中に存在することが知られていたが(Olsson J.E., Sherman M.S., and Kjessler B., *Lancet*, ii, 347-348, 1974; Adinolfi M., Haddad S. A., Beck S.E., Fung I.L., and Osserman E., *Experientia*, 32, 53-55, 1976)、破水との関連性に関する検討は全く行われていなかった。そこで本発明者らは鋭意研究を重ねた結果、妊娠の体液中のL-PGDS濃度を測定し、その測定値を指標とすることより、正確かつ迅速に破水を検出できることを見い出し、本研究を完成せざるに至った。

【0012】すなわち、本発明は、被験者より採取した体液試料中のヒトリポカリン型プロスタグランジンD合成酵素濃度を測定することを特徴とする、破水の検出方法を提供する。

【0013】本発明はさらに、体液試料中のヒトリポカリン型プロスタグランジンD合成酵素濃度の測定を、免疫学的測定法により行うことを特徴とする、前記方法を提供する。

【0014】本発明はさらに、体液試料中のヒトリポカリン型プロスタグランジンD合成酵素濃度の測定を、ヒトリポカリン型プロスタグランジンD合成酵素に特異的なモノクローナル抗体を用いるサンドイッチELISA法により測定する、前記方法を提供する。

【0015】本発明はさらに、体液試料が頸管分泌液または膣内分泌液である、前記方法を提供する。本発明はさらに、破水が前期破水である、前記方法を提供する。

【0016】

【発明の実施の形態】本発明においてL-PGDSを測定する試料は被験者から採取した体液であり、具体的には膣内分泌液や頸管分泌液などが挙げられる。

【0017】体液中のL-PGDS濃度を測定する方法としては、L-PGDS濃度を正確に反映する測定法であれば特に限定はされず、例えば免疫学的測定法、酵素活性測定法が挙げられる。しかしながら、実際の臨床現場において、簡便に且つ多量の試料を同時に測定する必要性の観点から、L-PGDSに特異的なモノクローナル抗体又はポリクローナル抗体を用いたEIA、ELISA、RIA、FIA、ラテックス比濁法、ラテックス凝集法、免疫比濁法、免役比濁法

等の免疫学的測定法によるのが好適である。

【0018】上記の免疫学的測定法のうち、特に、L-PGDS特異的モノクローナル抗体を使用したサンドイッチELISA法が好ましく、該モノクローナル抗体としては、具体的には、ハイブリドーマ細胞株1B7 (FERM BP-5709)、7F5 (FERM BP-5711)、6F5 (FERM BP-5710)、9A6 (FERM BP-5712)、10A3 (FERM BP-5713) より產生される抗体が挙げられる。

【0019】ELISA法においては、まず上記モノクローナル抗体のいずれかを第一抗体として担体に固定化する。担体としては固体担体が好ましく、例えばスチレンやポリスチレンなどの高分子担体を用いて成型されたELISAプレートなどの容器を使用できる。モノクローナル抗体の担体への固定化は、例えばモノクローナル抗体を炭酸緩衝液やホウ酸緩衝液などの緩衝液に溶解して担体に吸着させることにより実施できる。他方、第二抗体としては、ポリクローナル抗体を用いてサンドイッチELISAとすることができます。あるいは、後述する実施例で記載するように、本発明のモノクローナル抗体の1つを第一抗体とし、別のモノクローナル抗体を第二抗体として用いるサンドイッチELISAを用いると、L-PGDSをより確実に精度よく検出できる。

【0020】本発明によるL-PGDSの測定方法の一例を以下に説明する。まず抗体吸着用緩衝液を用いて第一抗体をマイクロプレートに分注してインキュベートし、上清を除去した後、洗浄液を用いて洗浄する。同様に、ブロッキング液、測定用試料溶液、標識化第二抗体の順に分注、インキュベート、洗浄を繰り返す。最後に基質溶液を分注し、室温又は37°Cで保持した後、405nmと490nmにおける吸光度の差(A405nm-A490nm)を測定し、別途L-PGDSの標準希釈系列から作成した標準曲線を用いることにより、L-PGDSの濃度を算定することができる。

【0021】また、サンドイッチ法による測定に際しては、既に本発明者らにより確立されている、上記モノクローナル抗体を含むL-PGDS検出キットを利用すればさらに簡単かつ正確に測定することができる(国際公開番号WO97/16461)。

【0022】本発明の方法では、上記手段で測定した被験者の体液中のL-PGDS濃度をもとに、破水を正確に検出することができる。特に、本発明の方法は、癌胎児性フィプロネクチン(fFN)測定では正確に検出できない破水状況でも、早期に、かつ正確に検出できることが明らかとなった。本発明の方法により破水時期を正確に知ることができるようにになり、前期破水(PROM)のマネジメントを容易に行うことが可能になる。

【0023】以下に、本発明を実施例により更に詳細に説明するが、本発明の範囲はこれら実施例に何ら限定されるものではない。

【0024】

【実施例】参考例：体液中L-PGDS濃度の測定

(1) 標準曲線の作成

まず、L-PGDSと結合可能な抗L-PGDSモノクローナル抗体（クローン：7F5）を50mM炭酸緩衝液（pH 9.6）に4.4μg/mlになるように希釈し、96ウェルマイクロタイターブレートに300μl/ウェルずつ加えて、4°Cで一晩放置し固相化した。このプレートをリン酸緩衝生理食塩水（pH 7.4、以下PBS）で3回洗浄した後、0.2%カゼインを含むPBS（pH 7.4、以下ブロッキング液）を300μl/ウェル加えて30°Cで90分インキュベートし、ブロッキングを行った。

【0025】次いで、ブロッキング後のプレートを0.05%Tween20を含むPBS（T-PBS）で3回洗浄した後、100μlの標準L-PGDS溶液（CSFより純化したL-PGDSをブロッキング液で段階希釈することにより調製）を各ウェルに加え、30°Cで90分間インキュベートした。反応後、T-PBSで3回洗浄し、ブロッキング液で0.5μg/mlになるように希釈した西洋ワサビペルオキシダーゼ標識化抗L-PGDSモノクローナル抗体（クローン：1B7）100μlを各ウェルに加え、30°Cで90分間インキュベートした。T-PBSで3回洗浄した後、発色液（ABTS solution：ベーリンガーマンハイム社製）100μlを各ウェルに加え、30°Cで30分間インキュベートした後、停止液（1.5%シュウ酸）を100μlずつウェルに加え、プレートミキサーで攪拌して反応を停止させた。市販のプレートリーダー（スペクトラマックス250、モレキュラーデバイス社製）により405nmと490nmにおける吸光度の差（A405nm-A490nm）を測定し、標準曲線を作成した。

【0026】上記サンドイッチELISA法に用いたモノクローナル抗体（クローン：1B7、7F5）は、マウス腹腔内にブリストン1.0mlを注射し、その後2週間目にそれぞれの抗体産生細胞株を1×10⁶個マウスの腹腔内に移植し、2週間後に腹水を採取し、得られた腹水をプロテインAアフィニティカラムクロマトグラフィー操作にかけることにより得た（3~10mg/ml）。尚、上記モノクローナル抗体を産生する細胞株はそれぞれ上記モノクローナル抗体名に一致し、それぞれの細胞株は、工業技術院生命工学工業技術研究所（日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号）に、1B7についてはFERM BP-5709（原寄託日平成7年9月21日）、7F5についてはFERM BP-5711（原寄託日平成8年6月6日）として寄託されている。

(2) 試料中のL-PGDS濃度の測定

被験者より採取した腹内分泌液あるいは頸管分泌液を用い、上記のサンドイッチELISA法に従ってL-PGDS濃度を測定した。

【0027】腹内分泌液あるいは頸管分泌液の調製は以下の通り実施した。即ち、滅菌した綿棒を後腹円蓋部あるいは子宮頸管内に挿入し、約10秒間回して液体を吸着させた。次いで、綿棒を1mlの50mM Tris緩衝液（pH7.5）に浸し、吸着した液体を分散させたものを測定用試料とした。

【0028】実施例1：頸管分泌液中L-PGDS濃度と腹内分泌液中L-PGDS濃度の関係

参考例の方法に従って、妊娠36週~40週の妊娠16名の頸管分泌液および腹内分泌液中のL-PGDS濃度を測定した。

【0029】その結果、図1に示したように、両者の間には有意な相関性が認められることが明かとなった（r=0.832、p=0.0001）。このことより、破水との関連性を検討するための検体は、頸管分泌液と腹内分泌液のどちらを用いても良いことが示唆された。

10 【0030】実施例2：腹内分泌液中のL-PGDS濃度とfFN濃度の関係

妊娠19週~41週の妊娠78名を対象として、腹内分泌液中のL-PGDS濃度とfFN濃度を測定した。L-PGDSの測定は参考例の方法に従い、fFNの測定は癌胎児性フィブロネクチン測定キット（PTDチェック、ADEZA BIOMEDICAL社製）を用いて行った。

【0031】その結果、図2に示したように、両者の間には有意な相関性が認められることが明かとなった（r=0.604、p<0.0001）。このことより、腹内分泌液中のL-PGDSを測定することによって、破水の検出を行える可能性が示された。

20 【0032】実施例3：破水状況による腹内分泌液中L-PGDS濃度の変動

実施例2で検討した症例の破水状況を、外子宮口よりの羊水流出の有無、Nitrazine test、およびFerm testによって確認した。その結果を元に、各症例を、破水なし（61名）、破水兆候あり（5名）、破水あり（12名）の3群に分類した。破水兆候ありは、陣痛が既にあり、子宮口が4cm以上開大し、胎胞形成のある症例で、検体採取の後数時間以内に破水が確認された症例とした。各群におけるL-PGDS濃度をMann-WhitneyのU検定によって比較した結果を、図3に示す。

【0033】腹内分泌液中のL-PGDS濃度は、破水あり群で0.245±0.171（平均±標準偏差、以下同じ）μg/mlと、破水なし群の0.052±0.069μg/mlと比し有意に高値を示すことが明かとなった（p<0.0001）。更に、破水兆候あり群（0.200±0.068μg/ml）においても破水なし群と比し有意に高値を示すことが判明した（p<0.001）。一方、fFN濃度を検討したところ、ほぼ同様の結果が得られることが確認された（図4）。

【0034】以上の結果より、腹内分泌液中L-PGDS濃度を測定することによって、少なくともfFNと同様に、破水の検出を早期に行えることが明かとなった。

実施例4：母体血液混入の影響の検討

fFN測定による破水の検出では、母体血液混入による擬陽性が大きな問題とされている。そこで実施例3で分類した破水なし群の出血状況を調査し、腹内分泌液への母体血液混入の影響を検討した。結果は、Mann-WhitneyのU検定によって解析した（図5及び図6）。

50 【0035】破水なし群のL-PGDS濃度は、出血なし群で

0.050±0.069 μg/ml (n=53)、出血あり群で0.066±0.074 μg/ml (n=8)となり、両者の間に有意差は認められなかった(図5)。また、出血なし群と出血あり群の何れにおいても、破水兆候あり群または破水あり群との間に有意差が認められた(出血なし群vs破水兆候あり群: p<0.01、出血なし群vs破水あり群: p<0.0001、出血あり群vs破水兆候あり群: p<0.01、出血あり群vs破水あり群: p<0.005)。一方、fFN濃度は、出血なし群と出血あり群の間に有意差を認めた(図6、p<0.01)。更に、出血なし群は、破水兆候あり群(p<0.005)または破水あり群(p<0.001)との間に有意差を認めた。しかしながら、出血あり群は、破水兆候あり群または破水あり群との間に有意差を認めなかった。

【0036】以上の結果より、fFN測定では正確に検出できない破水状況でさえも、L-PGDS測定によって正確に検出することが可能であることが明かとなった。

実施例5：頸管分泌液を用いた検討

実施例1で検討した症例の破水状況を実施例3と同様に調査したところ、1名が破水ありで、他15名は破水なしであった。これら被験者の頸管分泌液中L-PGDS濃度は、破水なし: 0.034±0.023 μg/mlに対し、破水あり: 0.15 μg/mlと、破水ありで顕著に高値を示した。

【0037】一方、これら症例の出血状況を調査したところ、破水なし15名の内1名で出血が認められた。本症例の頸管分泌液中L-PGDS濃度は0.057 μg/ml、fFN濃度は1060ng/mlであった。破水および出血の認められなかった症例の頸管分泌液中L-PGDS濃度は0.032±0.023 μg/mlと、出血症例と比べ大きな相違は見られなかったが、fFN濃度は76±180ng/mlと、出血症例より顕著に低値であった。

10

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

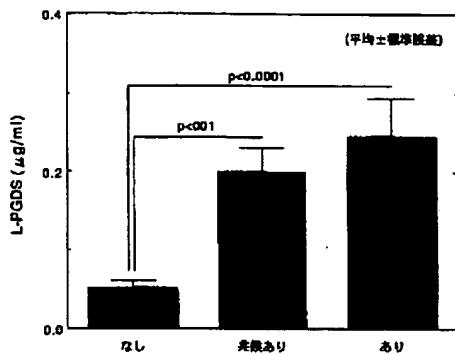
20

20

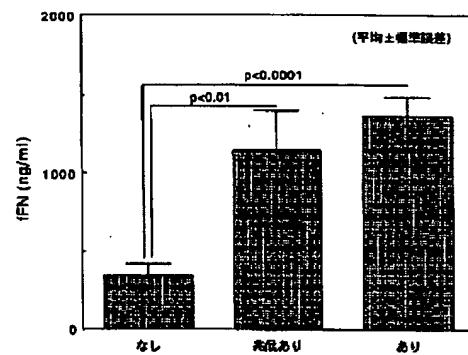
20

20

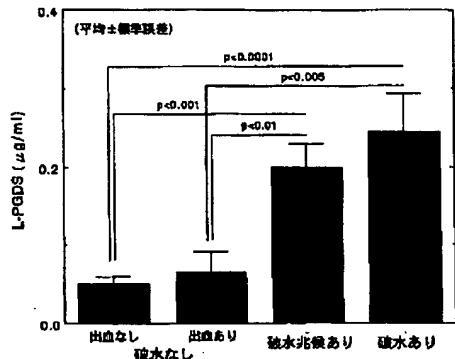
【図3】



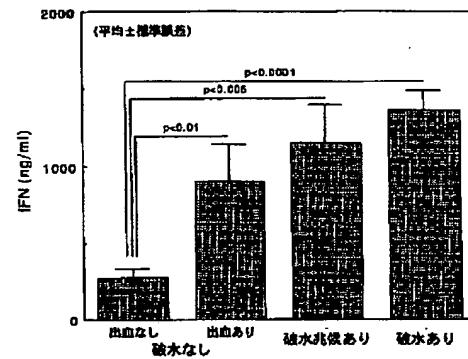
【図4】



【図5】



【図6】



フロントページの続き

(72)発明者 清木 興介
茨城県つくば市和台16-2 マルハ株式会社
中央研究所内
(72)発明者 中島 浩
茨城県つくば市和台16-2 マルハ株式会社
中央研究所内

(72)発明者 佐藤 信行
茨城県つくば市和台16-2 マルハ株式会社
中央研究所内
(72)発明者 裏出 良博
京都府京都市中京区西洞院通蛸薬師下ル古
西町440藤和シティコーポ706
F ターム(参考) 2G045 AA27 AA40 CB15 CB30 DA59
FA11 FA29 FB03 GC10